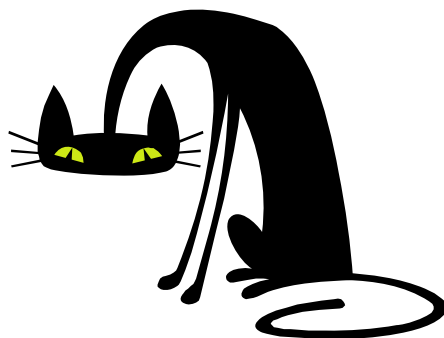


**SIGNALTRANSDUKSJON FRA EGF-RESEPTOR  
SOM ANGREPSPUNKT FOR  
ANTITUMOR-MIDLET  
GEFITINIB**



**PROSJEKTOPPGAVE FOR MEDISIN  
AV MINA LAM**

**VEILEDER THORALF CHRISTOFFERSEN**

**FARMAKOLOGISK INSTITUTT  
UNIVERSITETET I OSLO**

**VÅREN 2007**

## FORORD

*Denne oppgaven er skrevet for å oppnå cand.med. ved Farmakologisk institutt, Universitetet i Oslo. Jeg har mottatt økonomisk støtte fra Kreft foreningen og fra forskningsrådet mens jeg arbeidet på instituttet.*

*Jeg vil gjerne takke veilederen min Thoralf Christoffersen, Olav Dajani, Tormod Guren og Dagny Sandnes, som har vært tilgjengelig for spørsmål, råd og utmerket veiledning. Eva Østby og Monica Aasrum for teknisk hjelp på laboratoriet. Olav Dajani for illustrerende grafer brukt i oppgaven. En spesiell takk til min samarbeidspartner Peggy Lilleby som jeg har delt arbeidsplass med og mine faglige interesser.*

Oslo, mars 2007

Mina Lam

## INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	1
<b>SAMMENDRAG/ABSTRACT</b> .....	3
 <b>Kapittel 1: INNLEDNING</b>	
1.1 BAKGRUNN.....	4
1.1.1 EGF-RESEPTOR.....	4
1.1.2 NEDSTRØMSAKTIVERING.....	5
1.1.3 ANGREPSPUNKTER I FARMAKOLOGISK TERAPI.....	8
1.2 CELLEMODELLER.....	9
 <b>Kapittel 2: EKSPERIMENTELLE METODER</b>	
2.1 MATERIALER OG LØSNINGER.....	10
2.2 METODE.....	11
 <b>Kapittel 3: RESULTATER</b>	
3.1 METODEUTREDNING.....	14
3.1.2 USTABIL DETEKSJON AV ERK-BÅND PÅ WESTERN BLOTTING.....	14
3.1.3 BÅNDAVVIK.....	16
3.2 EFFEKT AV GEFITINIB PÅ EGF-INDUSERT ERK-AKTIVITET.....	17
3.2.1 DOSE-VIRKNINGSKURVE FOR GEFITINIB PÅ HEPATOCYTTER.....	17
3.2.2 DOSE-VIRKNING FOR GEFITINIB PÅ MH1C1.....	18
3.2.3 DNA-SYNTSE SOM EN FUNKSJON AV GEFITINIB PÅ HEPATOCYTTER OG HEPATOMCELLER.....	19
 <b>Kapittel 4: DISKUSJON</b>	
4.1 METODEUTREDNING.....	21
4.1.1 USTABIL DETEKSJON AV ERK-BÅND PÅ WESTERN BLOTT.....	21
4.1.2 BÅNDAVVIK.....	22
4.1.3 KONKLUSJON.....	22
4.2 DOSE-VIRKNINGSSAMMENHENG FOR GEFITINIB PÅ ERK-AKTIVITET.....	23
 <b>LITTERATURHENVISNING</b> .....	24

# **THE SIGNAL TRANSDUCTION OF THE EGF RECEPTOR AS TARGET FOR ANTITUMOR ACTIVITY OF GEFITINIB**

## **ABSTRACT**

Human carcinomas frequently overexpress the EGF receptor. Preclinical studies have shown that blocking of the EGF receptor may inhibit the malignant growth in model system in vivo and in vitro. One way to inhibit the EGF receptor is to use a low-molecular weight EGF inhibitor as gefitinib (Iressa, ZD1839). In this study I have looked at the effect of gefitinib on hepatocytes and hepatoma cells (MH1C1) in rats. I have also studied using Western blotting the activation of Erk (subtype of MAP kinases), which is important for several fundamental functions in cells, including cell proliferation.

While working with the Western blot, I experienced some detection problems. Bands disappeared rapidly after the detection process. In this research I have suggested hypotheses and interventions to the problem but without succeeding to find a proper answer of this matter. Other detected abnormal bands were easily corrected and described in this research.

I have seen with my investigation that in the presence of gefitinib the EGF receptor-mediated activation of Erk is more sensitive in MH1C1 cells than in hepatocytes. In MH1C1 cells this total inhibition occur at  $10^{-6}$  M gefitinib, with half-maximal inhibition between  $10^{-8}$  M and  $10^{-6}$  M. The hepatocytes is inhibited totally at the concentration  $10^{-5}$  M of gefitinib and the half-maximal inhibition is between  $10^{-7}$  M and  $10^{-6}$  M.

## KAPITTEL 1: INNLEDNING

I noen humane cancerceller er det blitt påvist et høyt nivå av aktivitet i reseptorfamilien EGF-reseptor, spesielt overekspressjon av ErbB-reseptor og EGF-reseptor (EGFR). Flere observasjoner tyder på at EGFR og ErbB(2) kan spille en viktig rolle i kreftutviklingen, og de er derfor kandidater for angrepspunkter i kreftterapi.

Prekliniske studier viser at blokkeringen av funksjonen til EGFR eller ErbB(2) enten med monoklonale antistoffer (MAbs) som binder seg ekstracellulært eller med en inhibitor av de katalytiske domene til tyrosin kinase, supprimerer malign vekst i modellsystemer in vitro og in vivo. Dette har vist seg i noen tilfeller å være gunstig i kombinasjon med kjemoterapi eller strålingsterapi som har potensert cytotoxisiteten i kreftbehandlingen (Mendelsohn et al., 2000).

Hensikten med denne oppgaven er å se på forskjeller i respons og sensitivitet av EGF-reseptor-mediert aktivisering av Erk i hepatocytter og hepatomceller (MH1C1) fra rotte under eksponeringen av en lavmolekylær EGF-kinase-inhibitor som gefitinib (Iressa, ZD1839). I tillegg drøftes det ulike metodiske problemstillinger som dukket opp underveis under arbeidet med Western blotting.

### 1.1 BAKGRUNN

#### 1.1.1 EGF-reseptor

EGF-reseptorfamilien er det mest studerte vekstfaktor-reseptorsystemet. Den utgjør subklasse I i reseptor tyrosin kinase (RTK)-superfamilien med fire homologe medlemmer: epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1/HER1)<sup>1</sup>, ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) og ErbB4 (HER4).

Disse reseptorene er bygd opp av en ekstracellulær ligand-bindingsregion med fire domener (I-IV; L1, CR1, L2, CR2), et hydrofobt og transmembranalt segment og en juxtamembranal tyrosin kinasedomene med regulatorisk terminalt segment (Wujcik D, 2006; Holbro et al., 2004; Jorissen et al., 2003). ErbB3 avviker fra denne regelen med å mangle en intracellulær tyrosin kinasedomene. Dette gjør at ErbB3 kan fungere som en plattform for å utvide rekrutteringen av intracellulære proteiner forutsatt at den blir fosforylert av andre medlemmer av EGFR-familien (Schlessinger, 2000). Denne spesielle oppbygningen av RTK ligger til grunn for de mange funksjoner som celleproliferasjon, morfogenese, differensiering, metabolsk regulering og cellemotilitet.

Vi kan dele inn agonistene til ErbB-reseptorene i tre grupper: EGF (epidermal growth factor)<sup>2</sup>, TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ) og amfregulin (AR) har affinitet for ErbB1. Betacellulin (BTC), heparin-binding EGF (HB-EGF) og epiregulin (EPR) binder seg til ErbB1 og ErbB4. Den tredje gruppen består av neuregulin (NRG) som kan aktivere ErbB3/ErbB4-reseptor (NRG-1 og NRG-2) eller bare ErbB4 (NRG-3 og NRG-4). Det er ikke blitt påvist ligander som har direkte høy-affinitet for ErbB2 (Schlessinger, 2000; Mendelsohn et al., 2000).

Aktivisering av ErbB-reseptor med ligandbinding i domene I og III vil føre til intramolekylær interaksjon i dimeriseringsdomene II og IV. Ligandindusert reseptordimerisering vil enten danne homo- eller heterodimeriserte reseptorkomplekser.

---

<sup>1</sup> EGF-reseptor:  $M_w = 170\,000$  og består av 1186 aminosyrer (AS). Polypeptid-forløperen til EGF-reseptor består av 1210 AS.

<sup>2</sup> EGF: vekstfaktor på 6,0 kDa og består av 53 AS.

ErbB2 er et unntak med mangel på ligandbinding og fiksert morfologisk konformasjon. Den er derfor foretrukket som dimeriseringspartner på grunn av disse forskjellene i konfigurasjonen (Mendelsohn & Baselga, 2000).

Samtidig som reseptoren aktiveres, skjer det også en nedregulering og internalisering av ligand-EGFR-komplekset. Varigheten og styrken på det intracellulære signalet fra EGFR kontrolleres av bla. resirkuleringen av reseptorene. Det intracellulære signalet moduleres av heterodimeriseringen og av intracellulære signalmolekyler.

Neste steg i aktiveringstrinnet er intermolekylær trans- og autofosforylering som vil øke tyrosin kinaseaktiviteten og antall dokking-seter. EGFR-kinase vil katalysere overføringen av  $\gamma$ -fosfat fra ATP til C-terminale domener på EGFR (Schlessinger J, 2000). Signalproteiner med PTB (phosphotyrosine-binding) eller SH (Src homology region) 2 eller 3, for eksempel Crk, Nck, Eps15, Dok-R, PLC $\gamma$ , GAP, SHP-1, Grb2, cbl E3, eller intracellulær tyrosin kinase, Src, kan bli rekruttert til de fosforylerte tyrosinsetene.

### 1.1.2 Nedstrømsaktivering

To viktige signaleringsveier fra ErbB-reseptoren er de som involverer henholdsvis Ras-Raf-MAP kinase og PI-3 kinase (fig. 1). Disse nedstrømsveiene regulerer biologiske prosesser som apoptose, genekspressjon, proliferasjon og cellulær overlevelse.

#### *Ras-Raf-MAP kinase*

Ras-Raf-MAP kinasekaskaden starter med at dokking-proteinet Grb2 med SH2 domener binder seg til spesifikke fosfotyrosiner på aktivert RTK. Det oppstår påfølgende binding mellom dokking-proteinets SH3 domene og det prolinrike motivet på Sos (Son of sevenless). Sos er en Ras-aktiverende GEF (guanine nucleotide exchange factor)<sup>3</sup> som erstatter GDP med cytosolisk GTP på Ras. De tyrosin kinasereseptorene som mangler spesifikke fosfotyrosiner og derved ikke kan binde seg til Grb2-dokking, kan i stedet binde seg indirekte til Sos med adaptorproteinet Shc (A/B/C)<sup>4</sup>.

Reseptor-Grb2-(Shc-)Sos komplekset vil aktivere den membranforankrede Ras som tilhører superfamilien av monomeriske GTP-aser. Ras kan inaktiveres av GAP (GTPase-activating proteins) med å bli hydrolysert fra aktivert form bundet til GTP til inaktivert form bundet til GDP. Ras<sup>5</sup> er blitt assosiert med 30 % av humane cancer (Alberts et al., 2002) og med en enda høyere prosentandel av gastrointestinale cancere.

Egenskapene til Ras er komplekse og omfatter evne til "cross-talk" mellom signalveiene, feedback-sløyfer, relokalisering av proteiner og dannelser av proteinkomplekser. Ras vil videre aktivere og fosforylere serin/threonin-innholdende kaskader.

Det første leddet i denne kaskaden er MAPKK kinase (MEK kinase, MAP kinase 3, MAPKKK, MEKK, Raf-1). Et eller flere MAPKK kinase kan binde seg til MAPK kinase (MAP kinase 2, MAPKK, MKK, MEK) og øke kompleksiteten i signaleringen.

Det fins ulike MAP kinaser: Erk 1/2 (Extracellular signal-related kinase), JNK (Jun amino-terminal kinase 1/2/3), p38-protein ( $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ) og Erk5 (Bmk1, Big MAP kinase1), som MAPKK kan binde seg spesifikt til (Chang et al., 2001).

<sup>3</sup> GEF er også kjent som GNRP (guanine nucleotide releasing protein).

<sup>4</sup> Shc er en adaptorprotein med N-terminal (PTB-domene) og C-terminal (SH2-domene).

<sup>5</sup> Ras-familien inkluderer C-Ras, H-Ras, K-Ras og N-Ras. Disse er uttrykt i mange forskjellige celletyper. Ras tilhører en superfamilie av GTP-bindingsproteiner som Rho, Ral, Rab, Rac og Rap. De likner på Ras 30-55 %.

Erk er et evolusjonært bevart enzym som responderer på kjemisk og fysisk stress. Dette gir cellene evne til å regulere de biologiske prosessene og virke i samspill i et større nettverk. MAP kinase kan også initiere en negativ feedback-sløyfe som spalter Grb2-Sos komplekset ved å fosforylere Sos (Jorissen et al., 2003).

Neste trinn i kaskaden vil være avhengig av stimuleringen av RTK. Det er blitt beskrevet mange transkripsjonsfaktor for MAP kinase for eksempel c-jun, c-fos, c-myc, NF- $\kappa$ B, zinc-finger transkripsjonsfaktor som Spl, Ets-familien, forkhead transcription factors og Stat.

### *PI3-kinase*

PI3-kinase (PI3-K, phosphoinositide 3-OH kinase) er den viktigste anti-apoptotiske nedstrømvei for RTK, og aktiviteten til PI3-kinase er overuttrykt i mange tumorer. Det er også blitt observert at PI3-kinase har vært assosiert med inflammasjon, allergi og hjertesykdommer (Foster et al., 2003).

PI3-kinase kan aktiveres av RTK via Ras og av andre overflatereseptorer som GPCR (G-proteinkoblede reseptorer) via  $\beta\gamma$ -komplekset til det trimeriske G-proteinet. Lipid kinasen, PI3-kinase, har en regulatorisk subenhet (p85,  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ), som er en adaptorprotein med to SH2-domener og en SH3-domene, og en katalytisk subenhet (p110,  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ). Den regulatoriske subenheten til PI3-kinase binder seg til pTyr-seter på aktivert reseptor eller til fosforylerte dokking-proteiner som Gab1 og IRS1. Den katalytiske subenheten vil da fosforylere 3'-posisjon av inositolringen til inositol fosfolipider som PtdIns(4)P (fosfatidyl inositol 4-fosfat) og PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (fosfatidyl inositol (4,5)-bisfosfat) for å danne sekundære budbringere som PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> (fosfatidyl inositol (3,4)-bisfosfat) og PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (fosfatidyl inositol (3,4,5)-trifosfat).

De sekundære budbringere fungerer som dokking-bindingseter og vil rekruttere andre proteiner som inneholder PH (Pleckstrin homology) for eksempel Btk, Itk, PDK1, PKB, Grp1, Gab1, PLC $\gamma$ -1 (Schlessinger J., 2000).

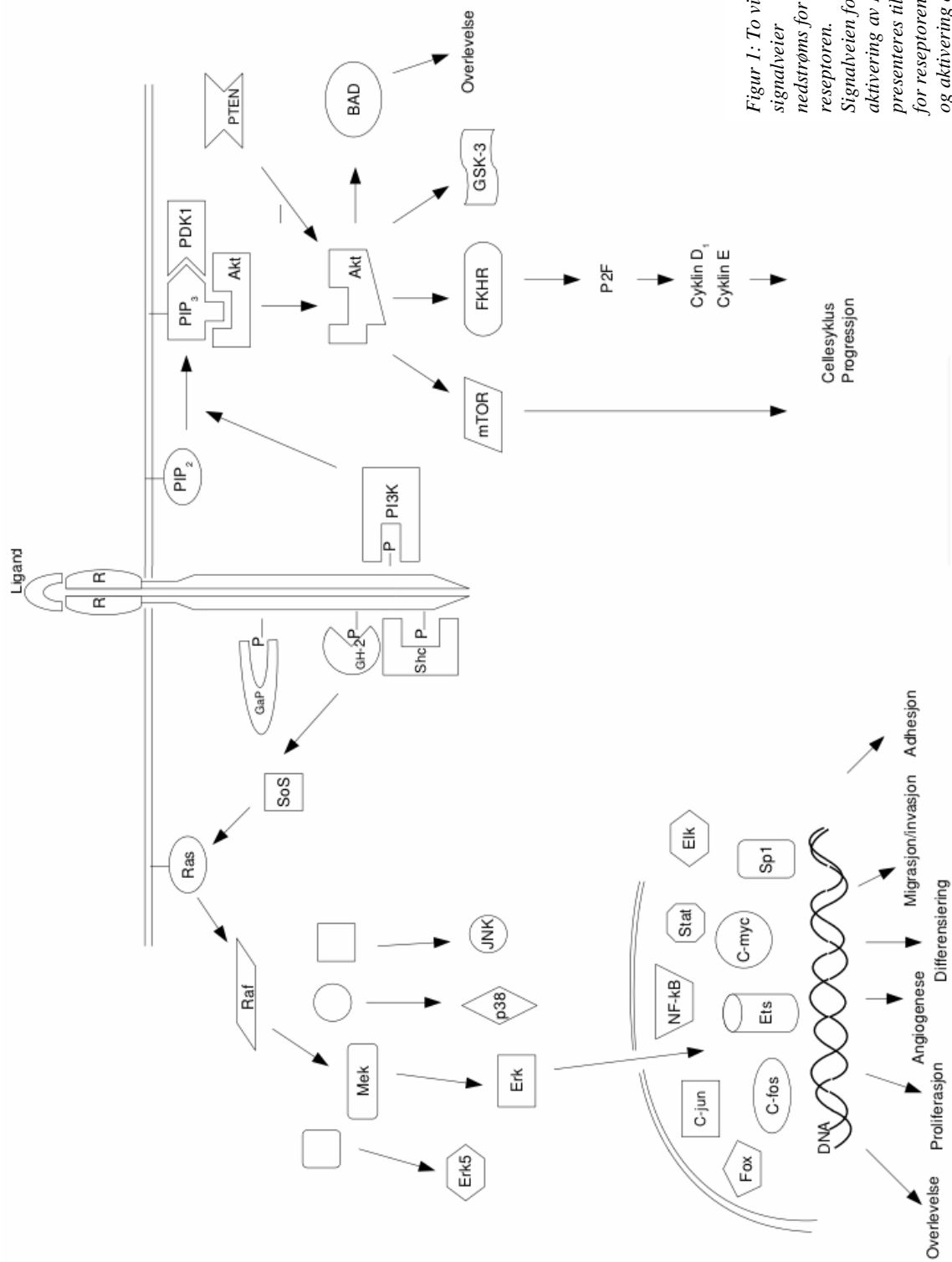
Effekten til PI3-kinase kan motvirkes av fosfataser som tumor suppressor PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted chromosome 10) ved defosforylering på 3'-posisjon. Fosfasen fungerer som negativ regulatorer for aktiveringen av Akt og PDK1. Mutasjoner på PTEN kan forlenge PI3-kinase aktiviteten og føre til kreftutvikling (Dancey JE, 2004).

Aktivering av Akt<sup>6</sup> (proteinkinase B, PKB) skjer ved binding til dokkingproteiner med PH-domener og vil føre til konformasjonsendring av proteinkinase. Akt blir så fosforylert av PDK1 (fosfatidylinositol-avhengige protein kinasen) på Ser473 og Thr308.

Aktivert Akt vil nå returnere til cytoplasma for å fosforylere målproteiner som BAD, FKHR1, enzymet kaspase-9 og NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B). Både PKB og PDK1 samt Mdm2, GSK-3 (glykogen syntase kinase-3), p27, IKK (IkB kinase) og mTOR (mammalian target of rapamycin) kan påvirke prosesser som glukoneogenese, proteinsyntese eller glykolyse.

---

<sup>6</sup> Det finnes tre subtyper av Akt kalt Akt 1 ( $\alpha$ ), 2 ( $\beta$ ) eller 3 ( $\gamma$ ).



Figur 1: To viktig signalveier nedstrøms for EGF-reseptoren. Signalveien for aktivering av Erk presenteres til høyre for reseptoren RTK og aktivering av Akt til venstre. Begge signalveiene er viktige for cellens vekst og overlevelse.



### 1.1.3 Angrepspunkter i farmakologisk terapi

I humane tumorer er EGFR ofte overrepresentert, for eks. i brystkreft, lungekreft, glioblastoma, blærecancer, kolorektal cancer, ovarie-carcinoma, prostatakreft og kreft i hode- og halsregionen (Mendelsohn & Baselga, 2003).

Det er tre type gener som kan bidra til kreftutviklingen i celler: onkogener, tumorsuppressor-gener og stabilitetsgener. Mutasjon og aktivisering av onkogener kan resultere i amplifisering eller translokering av kromosomer og affisere vitale regulatoriske signalveier for genprodukter. Tumorsuppressor-gener blir angrepet på en annen måte med genforandringer og redusert aktivitet i genproduksjonen. Stabilitetsgener, som mismatch repair (MMR), nucleotide-excision repair (NER) og base-excision repair (BER), reparerer små skader på DNA enten oppstått under DNA-replikasjonen eller mutasjon etter eksponeringer.

Mutasjonene er enten endrete basepar, små eller store delesjoner/insersjoner, amplifisering eller translokering. Mutasjonene forandrer DNA og derved genproduktene, og mange slike mutasjoner bidrar til utvikling av malignitet. Angrepspunkter rettet mot proteiner som er produsert av muterte gener er nåtidens mest effektive farmakologiske intervensjoner i cancerterapi (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Overekspressjon av EGFR eller forandrete glykolyserte ektodomerer blottet peptidens epitop og muliggjør antistoff-terapi (Jorissen et al., 2003). Anti-EGFR<sup>7</sup> monoklonal antistoffer som blokkerer reseptor-kinasen, som trastuzumab (Herceptin, Genentech) angriper genprodukter av amplifiserte ERbB2 i enkelte typer av brystkreft. Trastuzumab er en inhibitor av vekstfaktor-reseptoren på samme måte som gefitinib (Iressa, AstraZeneca), men i motsetning til trastuzumab er gefitinib en lavmolekylær kinaseinhibitor som angriper ERbB1 i stedet. Gefitinibs mekanismer er nærmere beskrevet i teksten under fordi inhibitoren er blitt brukt i mine forsøk som er beskrevet senere.

I signalveien nedstrøms for EGF-reseptor er det flere selektive kinaseinhibitorer som er under klinisk utprøving. Det er Ras-inhibitorer som R115777 og ISIS2503, Raf-inhibitorer som Bay 43-9006 og L-779,450. MEK-inhibitorer som PD 184352/CI-1040, mTor-inhibitor som rapamycin/sirolimus og cyklin-avhengige kinaseinhibitorer som CYC202 og E7070. Det finnes andre inhibitorer som går på andre angrepspunkter i cellen som PKC og PDK1 (Dancey & Sausville, 2003).

Mulighetene for inhibisjon av ulike komponenter nedstrøms for kinase-reseptoren er mange, og store utfordringer ligger i å finne en kombinasjon som hemmer kreftutviklingen effektivt uten noe særlige bivirkninger for pasienten.

Det er minst to utfordringer kreftforskere står overfor de neste 10 årene. Den ene utfordringen er oppdagelse av nye gener som har betydning for neoplasme-utviklingen, spesielt de som initierer og stopper prosesser. Den andre utfordringen er å utvikle nye måter å utnytte kunnskapen til pasientens nytte (Vogelstein & Kinzler, 2004).

#### *Gefitinib (Iressa, ZD1839)*

Gefitinib er en syntetisk anilinoquinazolin med lav molekylvekt. Det er produsert av AstraZeneca. Gefitinib angriper selektivt ErbB1-reseptoren, som en konkurrerende inhibitor av ATPs bindingssetet og reduserer aktiviteten til CDK2. Reduseringen av CDK2-aktiviteten fører til obligatorisk arrest i G<sub>1</sub>-fase og akkumulering av Rb-protein og p27<sup>KIP1</sup> med påfølgende nivåreduksjon av p27-proteiner. Proteinforandringene i cellene vil forsterke arresten i G<sub>1</sub>-veksten ytterligere. Cancerbehandlingen med gefitinib vil, dersom tumor er

<sup>7</sup>

EGFr står for EGF-reseptorfamilie

sensitiv, resultere i blokkering av proliferasjon, angiogenese og celledød. Tumorveksten vil bli hemmet og går i regresjon tilslutt (Holbro et al., 2004; Mendelsohn et al., 2000).

## **1.2 CELLEMODELLER**

Hepatocytter er blitt brukt som cellemodell for eksperimentelle studier med celleproliferasjon. Årsaken til det er at primærkulturene med hepatocytter har store fordeler. Reseptorene deres og de intakte signaleringsveiene viser stor evne til integrering med et bredt spekter av hormoner (Christoffersen et al., 2000).

MH1C1-celler er en cellelinje klonet fra et Morris-hepatom. Disse cellene har mange egenskaper som gjør dem egnet for studier i sammenlikning med hepatocytter.

## Kapittel 2: EKSPERIMENTELLE METODER

Western blotting (Wb) er et viktig verktøy i arbeidet på laboratoriet. Det er en analysemetode som gjør det mulig å detektere proteiner med immunblotting etter en vandringsseparasjon i gel-elektroforesen.

### 2.1 MATERIALER OG LØSNINGER

#### Cellelinjer:

##### *Hepatocytter:*

Wistars hannrotter, 170-230 g, ble matet ad libitum. De ble isolert i en to trinnsprosess in vitro av en kollagenase perfusjonsteknikk (Berry og Friend, 1969. Seglen, 1976) med modifiseringer beskrevet av Christoffersen et al., 1984. Hepatocytene ble videre sådd på Costar plastbrønner for kultivering med en celletetthet på mellom  $2 \times 10^4$  til  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ .

Medium for kulturdyrking er en serum-fri 1:1 kombinasjon av Wiliams medium E og Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM). Den endelige glukosekonsentrasjonen ble på 8,4 mM. Penicillin (67 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), kollagen (3 µg/ml), insulin og 25 mM dexametason ble tilsatt mediumet (Thoresen et al., 1998).

Kulturene ble oppbevart i 95 % luft/5 % CO<sub>2</sub> ved 37°C i 48 timer før avtakingen.

##### *MH1C1:*

Cellesplitting med Trypsin-EDTA (1:250, 1×C). Cellene ble forbehandlet med serum-nøytraliserende Dulbeccos PBS ( $2 \times 5$  ml). Utsæd på Costar plastbrønner med celletetthet på ca.  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$  til medium 0,2 ml/cm<sup>2</sup>. Celletelling ble utført på Bücher-kammer.

Kulturmediumet er en Dulbeccos modifisert Eagles medium (DMEM) tilsatt Pen Strep 100 units/ml, 2 mM glutamin og 10 % hesteserum.

#### Western blotting (Wb):

- Samplebuffer (buffer A, SDS-reduserende buffer) 2xC er 0,5 M TRIS/HCL (pH 6,8), 10 % glyserol og 10 % (w/v) sodium dodesylsulfat (SDS)
- Laemmlibuffer (buffer B) inneholder buffer A, 10 % 2-merkapttoetanol og 5 % (w/v) bromfenolblått (BFB)
- 100 ml Akrylamide/BIS (N<sup>1</sup>N<sup>1</sup>-bis-metylene-akrylamid), 29:1 kombinasjon
- 1,5 M TRIS/HCL, pH 8,8 og 0,5 M TRIS/HCL, pH 6,8
- 10 % ammonium persulfat (APS)
- TEMED (N,N,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-tetrametyletylenediamin)
- Running- eller elektroforesebuffer (5×C, 1000 ml, pH 8,3) bestående av TRIS, glysin og SDS
- Transfer- eller Towbinbuffer pH 8,1-8,3 er 25 mM TRIS, 192 mM glysin og 20 % metanol
- TBS inneholder TRIS og NaCl. TTBS inneholder TBS og 0,05 % Tween-20
- Blotto er 5 % blandingsløsning av tørrmelk og TTBS
- Ponceau S (Sigma, 1 l): 0,1 % Ponceau S (w/v) og 5 % 5-eddiksyre (v/v)
- 0,45 µm nitrocellulose membrane (Transfer-medium, Trans-blot<sup>®</sup>), Bio Rad, 8×5 cm<sup>2</sup>
- ECL (Enzybundet kjemi-luminescens reagens), Amersham Biotech
- X-ray fixer (AL4, Kodak) er en fikseringsvæske, pH 3-6
- X-ray developer (LX24, Kodak) er en fremkalder-væske

**Reagens:**

- Epidermal vekstfaktor (EGF)
- EGF-kontroll: Steril 0,9 % NaCl
- Iressa-kontroll: Steril 10 % dimetyl sulfoksid (DMSO)

**Antistoff:**

- Inhibitor:
  - Iressa (Gefitinib, ZD1839, Astra Zeneca): reversibel lavmolekylær inhibitor av EGF-reseptor
- Primært antistoff:
  - Fosforylert ekstracellulær signalregulerende kinase (pErk): Fosfo-p44/42 MAP kinase (Thr 202/Tyr 204) E10 monoklonal Ab (1:3500), Cell signaling
  - Total ekstracellulær signalregulerende kinase (TotalErk): Anti-MAP kinase/Erk 1/2-CT (1:6000), Upstate
- Sekundært antistoff:
  - For pErk: Geit anti-mus IgG (H+L)-HRP konjugat, 2 ml (1:3000), Bio Rad
  - For totalErk: Geit anti-kanin IgG (H+L)-HRP konjugat, 2 ml (1:3000), Bio Rad

**2.2 METODE****Cellelysering til Western blott:**

Cellene ble inkubert etter tabell 1 med 60 µl EGF (5 min), 60 µl EGF-kontroll (5 min), 30 µl Iressa (30 min) og 30 µl Iressa-kontroll (30 min) før celleavskrapningen. Etter at inkubasjonstiden var over, ble cellene skyllet raskt to ganger med steril 0,9 % NaCl før det ble tilsatt 500 µl buffer A.

Cellelaget ble så skrapet av med en Costars policeman, og løsningen ble overført til TT-rør for koking. Etter 5 min med koking ble det tilsatt 30 µl merkaptotanol og 15 µl BFB, og løsningen kokte ytterlig 5 min til.

**Dose-virkning for gefitinib (Iressa)**

Prøvenr	Reagens		Prøvenr	Reagens	
1	C <sub>I</sub> =10 % DMSO	C <sub>E</sub> =0,9 % NaCl	7	C <sub>I</sub> =10 % DMSO	C <sub>E</sub> =0,9 % NaCl
2	C <sub>I</sub> =10 % DMSO	EGF	8	C <sub>I</sub> =10 % DMSO	EGF
3	Iressa 10 <sup>-8</sup> M	EGF	9	Iressa 10 <sup>-8</sup> M	EGF
4	Iressa 10 <sup>-7</sup> M	EGF	10	Iressa 10 <sup>-7</sup> M	EGF
5	Iressa 10 <sup>-6</sup> M	EGF	11	Iressa 10 <sup>-6</sup> M	EGF
6	Iressa 10 <sup>-5</sup> M	EGF	12	Iressa 10 <sup>-5</sup> M	EGF

Tabell 1: Oppsettet gjelder både for hepatocytene og MH1C1-cellene. C<sub>I</sub> er Iressa-kontroll. C<sub>E</sub> er kontroll for EGF. Hver prøve er applisert med to reagenser. Iressa er angivet med konsentrasjonen oppgitt i Molar (M).

**Ukontinuerlig SDS-polyakrylamid gel-elektroforese (PAGE):**

Støpeprosessen av polyakrylamid gel bestod av to trinn: en separasjonsgel og en stacking-gel. Støpesettet ble montert etter anvisning fra Bio Rad. Separasjonsgelen (12 %) ble først preparert og bestod av 30 % akrylamidløsning, 1,5 M TRIS, sterilt vann, 10 % SDS,

10 % APS og 0,05 % TEMED. Stacking-gelen ble så applisert over den ferdig støpte separasjonsgelen, og Teflon<sup>®</sup> kammen plassert ned i løsningen for å støpe prøvebrønnene i stacking-gelen. Standard stacking-gel inneholdt 30 % akrylamidløsning, 0,5 M TRIS, sterilt vann, 10 % SDS, 10 % APS og TEMED.

Immunpresipitater eller alikvoter på 8-10 µg celleproteiner (total cellelysering preparert i Laemmli buffer) ble applisert i prøvebrønnene. Elektroforesebufferen ble laget etter anvisning og hellet over det indre kammer av PAGE. PowerPac 300 ble koblet til elektroforese-cellen på 100 V i 5-8 min og kjørt videre på 200 V til fargekanten nådde bunnen av gelen.

Polyakrylamid-gelen består av polymeriserte kjeder av akrylamid som er kryssbundet med en bifunksjonell agens, bisakrylamid. Disse bindingene tilfører gelen rigiditet og tensil styrke til å stabilisere gelporene som SDS-polypeptid-kompleksene må passere under vandringsseparasjonen i elektroforesen. Porestørrelsen justeres etter størrelsen til polypeptidet som er av interesse for videre undersøkelse slik at ved å øke bisakrylamid:akrylamid ratio i gelen, så reduseres porestørrelsen.

APS fungerer som initiator og pådriver av polymeriseringsreaksjonen med å tilføre frie radikaler til løsningen. TEMED katalyserer og derved akselererer polymeriseringen på grunnlag av disse frie radikalene.

SDS i laemmli-buffer blir tilsatt for å maskere den positive ladningen i kjeden til polypeptidene som reflekterer aminosyrenes sammensetning. SDS er en kraftig anionisk detergent som har affinitet til hydrofobiske regioner på proteinmolekyler med en metning på 1,4 g SDS/1 g polypeptider. Denne porposjonaliteten er uavhengig av aminosyresekvensene.

Merkaptoetanol, en reduserende agens, bryter de kovalente disulfid-bindingene. Disse kovalente bindingene er sterke bindinger som gir proteinene sine naturlige tredimensjonale struktur. Bidraget fra merkaptoetanol, SDS og kokingen under cellelyseringen denaturerer proteiners naturlige form, og de individuelle polypeptidkjedene kan analyseres atskilt.

Stacking-gel og separasjonsgel er støpt med forskjellig pH og ionisk styrke. Grunnen til dette er at man ønsker å lage et ukontinuerlig buffersystem som danner en vertikal migrerende enhet under elektrisk spenning mellom to tilkoblede elektroder. Fordelen med dette buffersystemet er at proteinkomplekser som er applisert på gelen, blir konsentrert til små volumpakker. Inne i den svært porøse stacking-gelen blir polypeptidene samlet og deponert på separasjonsgelen i båndsoner.

Selve separasjonsvandringen innebærer at klorid-ionene i gelen vandrer og danner en ledende ende i migrasjonssenheten, mens glysinmolekylene i stacking-gelen legger seg bak polypeptidene. Sonen mellom kloridionene og glysinmolekylene har lav konduktivitet og steilere spenningsgradient. Dette skyver polypeptidene fremover og deponerer dem på toppen av separasjonsgelen. Glysinmolekylene blir ionisert i separasjonsgelen pga den høye pH-en og vandrer gjennom båndsøylene med polypeptidene for så å legge seg bak kloridionene i den ledende enden. På denne måten med oppkoblingen av elektroforesen til et elektrisk felt får celleproteinene i gelen til å vandre mot katioden med en spesiell orientering avhengig av netto ladning, størrelse og struktur på celleproteinene.

Store polypeptider vandrer saktere enn små polypeptider fordi friksjon oppstår pga porestørrelsen. På denne måten blir en kompleks blanding av proteiner fraksjonert i serier av diskrete proteinbånd og ordnet etter den molekylære vekten.

### **Overføring (transfer) eller blotting:**

Nitrocellulosemembran og Whatman 3 MM filterpapir ble på forhånd fuktet i Towbinbuffer og plassert i Trans-Blot SD semi-tørr cellemodul i en sandwich: vått filterpapir-gel-membran-vått filterpapir. PowerPac 200 ble satt på 20 V i 30 min, og proteinovergangen sjekket ved hjelp av Ponceau S.

På dette trinnet blir proteinene immobilisert på en syntetisk membran. Filterpapirer som er fuktet i Towbinbuffer fungerer som ione-resevoir og sammen med høy elektroforetisk intensitet legges forholdene til rette for en rask og effektiv proteinmigrasjon og dannelse av kovalente bindinger til nitrocellulosemembranen.

Ponceau S med kortvarig virkning er sensitiv for deteksjon av proteiner fiksert på nitrocellulosemembranen. Løsningen er derfor effektiv for kontroll av protein-overføringen.

### **Immunblotting:**

Membranen med overførte proteiner ble blokkert for uspesifikke bindingssteder med Blotto i 1 t før tilsetning av primært antistoff. Dette ble inkubert over natten i kjølerommet, og membranen ble vasket dagen etter med TTBS for fjerne "løse" antistoffer som ikke hadde bindet seg til nitrocellulosemembranen. Sekundært antistoff ble tilsatt etter vaskingen og inkubert i 1,5 t. Membranen ble skyllet godt med sterilt vann og var klar for deteksjon på filmrommet.

Uspesifikke bindingssteder blokkeres for irrelevante proteiner fordi proteiner i immunologiske reagenser kan binde seg lett til nitrocellulosemembranen og gjør immunblottingen mindre sensitiv.

Probingen av målproteiner foregår i to stadier med inkubering av et primært antistoff som binder seg til spesifikke antigenepitoper. Det sekundære antistoffet som er koblet til HRP (Horseradish peroxidase) binder seg til F<sub>c</sub>-delen til det fikserte primære antistoffet.

### **Deteksjon eller eksponering:**

Membranen ble puttet i en ECL-løsning (60 sek) og plassert i en filmkassett mellom to ferdigklippede transperanter. Membranen ble fotografert i mørkeromsboks (alternativet er med Labworks Software (UVP, Cambridge, UK). Hyperfilmene, som ble eksponert av membranen inne i filmkassetten, ble lagt deretter over i fremkalde- (AL4) og fikseringsvæske (LX24). Hyperfilmene ble vasket tilslutt med sterilt vann før opphengingen til tørk.

3,3'-diaminobenzidin (DAB) i ECL-løsningen er et sensitivt substrat for HRP, og i hverandres nærvær vil HRP spalte DAB til et brunt presipitat (lysglimt). Dette lysglimtet kan detekteres på film (UVP eller mørkeromsboks).

### **Oppbevaring:**

Gjenbruk av membranen med overførte proteiner forutsetter "stripping" av inkuberte antistoffer. Det gjøres ved vasking i 0,5 M NaOH. Membranen ble lagt i plastfolie i kjøleskapet for lagring og gjenbruk.

## Kapittel 3: RESULTATER

Resultatene som presenteres skal prøve å kaste lys over to problemstillinger som innledningsvis ble beskrevet. Den videre diskusjonen vil foregå under kapittel 4.

Den første problemstillingen vil dreie seg om avvikende blott som brukes i diskusjonen av metodologi under kapittel 4. Den andre problemstillingen gjelder om dose-virkningsreaksjon av EGF-reseptor-mediert aktivering av Erk på hepatocytter og hepatomceller (MH1C1) hos rotte, under eksponeringen av en lavmolekylær EGF-kinaseinhibitor som gefitinib (Iressa, ZD1839).

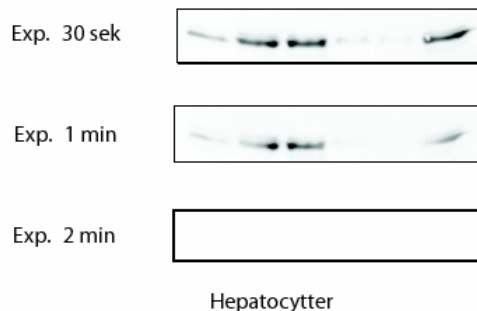
### 1.2 METODEUTREDNING

#### 3.1.2 Ustabil deteksjon av Erk-bånd på Western blotting

Da jeg arbeidet med deteksjon av Erk-bånd på Western blotting, ble båndsvetningen på filmene mine kort tid under deteksjonsprosessen redusert. Andre ganger opplevde jeg at filmene uventet ble blanke. Ved et tilfeldig forsøk fikk jeg dokumentert denne ustabile deteksjonen av Erk-bånd på Western blotting. Resultatet presenteres i fig. 2.

Den første filmen som ble lagt i filmboksen var eksponert i 30 sekunder. Med noen minutters mellomrom ble den andre filmen eksponert i et minutt i den samme filmboksen. Den tredje filmen ble lagt på og eksponert i to minutter et kvarter senere.

Alle båndene og filmene er fra samme forsøk. Likevel kan vi se en uventet rask svekkelse i båndsvetningen allerede etter et par minutter og tilnærmet null svertning av filmen etter et kvarter. Resultatet ble en rask progredierende forsvinning av båndene. Båndene var utsatt for det samme miljøet og ble stilt under de samme betingelsene. Vanligvis så ser vi ikke denne raske og uventete svekkelse av båndsvetningen, men en langsom og gradvis reduksjon svertning slik at det blir nok tid til å fremkalle blott på filmrommet.



*Fig. 2: Ustabil deteksjon av Erk-bånd på Western blotting. Et tilfeldig forsøk som viser den raske reduksjonen i filmsvertningen.*

Under eksponeringen eller deteksjonen blir DAB (3,3'-diaminobenzidin) i ECL-løsningen spaltet av HRP (Horseradish peroxidase) som er bundet til det sekundære antistoffet. Det sekundære antistoffet er igjen bundet til det primære antistoff-proteinkomplekset. Spaltningen av DAB gir et brunt presipitat (lysglimt) som fanges opp av hyperfilmen (2.2 metode, s.13), og båndsvetningen blir detektert på film. Dette tyder på at denne prosessen skjer for fort ved forsvinning av båndene.

### **Resultat av ulike tiltak**

Ulike hypoteser og tilnærminger ble prøvd for å komme nærmere svaret på problemet. Resultatene blir diskutert og konkludert under kapittel 4.

#### *Forurensning:*

Forurensede utstyr og løsninger kan ha katalysert og interagert med spaltningsprosessen. Dette kan ha forstyrret og bidratt til en ustabil deteksjon. Vi vasket utstyr i egnede løsninger og økte bruken av engangsutstyr. Det ble større bevissthet rundt forurensning på laboratoriet. Tiltaket forbedret ikke situasjonen, og filmene ble fortsatt blanke.

#### *Løsningsendring eller oppbevaringsfeil:*

pH-forandringer i løsningene, enten de var for gamle eller oppbevart på feil måte, kan ha utløst problemet. Det ble også rettet en mistanke mot uholdbare sekundære antistoff-løsninger. Vi hadde ofte observert at lokkene på disse beholderne ikke alltid satt godt på. Sekundære antistoff-løsninger ble fortynnet fordi vi trodde at løsningene hadde blitt konsentrerte pga fordampningen som oppstod når løsningene ikke ble oppbevart på en riktig måte. Nye løsninger av det sekundære antistoffet ble også kjøpt inn, men ingen av tiltakene endret situasjonen.

#### *ECL-løsninger:*

Gamle eller defekte ECL-produkter vil kunne påvirke deteksjonen. Forsøk med to ECL-løsninger fra to ulike produsenter ble testet i et forsøk: ECL fra "KPL-your detection research" og ECL fra "Amersham".

ECL fra "KPL-your detection research" var mer sensitiv og hadde bedre deteksjonsevne enn ECL fra "Amersham", men forsvinningen av båndene rammet begge filmene som jeg hadde brukt de to ulike ECL-løsningene på. Filmene ble blanke og ikke tatt vare på.

#### *Overføring (transfer) eller blotting:*

Redusert sensitivitet til deteksjonsmetoden kan skyldes dårlig kontakt mellom membranen og gelen. Luftbobler eller overskuddsbuffer kan bli værende i "sandwich-en" og øke avstanden mellom de ulike lagene og forårsake dårlig kontakt.

Begge filmene (fig. 3 og fig. 4) viser et forsøk med ulike konsentrasjoner av gefitinib på Erk-aktivering på hepatocytter fra samme celleprøve 17.02.06. Forskjellen på de to filmene er behandlingen av gelene i overgangen til cellemodulen for blotting. Ellers ble begge blottene behandlet likt og utsatt for den samme påvirkningen på laboratoriet.

Det første blottet ble behandlet som vanlig under overføringen av gelen til cellemodulen uten noe særlig anstrengelse for å redusere avstanden mellom de ulike lagene i "sandwich-en". Det andre blottet ble derimot hardhendt behandlet slik at både transfer-væsken og luftboblene ble presset ganske mye ut av "sandwich-en" (kontrollert med Ponceau S).

Med dette tiltaket syntes jeg at jeg fikk et bedre resultat på båndkvaliteten ved å klemme sammen "sandwich-en" med en spatel eller et rør. Derimot ser det ut til at hovedproblemet i ustabil deteksjon, ikke skyldes dårlig kontakt mellom membranen og gelen (fig. 3).



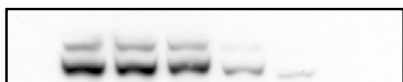


Fig. 3: Erk-aktivering under påvirkning av gefitinib på hepatocytter (celleprøve fra 17.02.06). Normal behandling under overføringen av gelen til cellemodulen med en spatel eller med et rør.

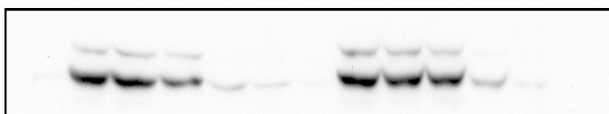


Fig. 4: Erk-aktivering under påvirkning av gefitinib på hepatocytter (celleprøve fra 17.02.06). Hardhendt håndtering av gelen under overføringen til cellemodulen med en spatel eller med et rør.

Siden filmene fra forsøkene som ble igangsatt ikke viste bånd og var blanke, så jeg ingen grunn til å ta vare på dem. For å gi et eksempel på en slik film så henviser jeg til den siste filmen i fig. 2 som ble eksponert i to minutter et kvarter senere den andre filmen.

### 3.1.3 Båndavvik

#### ”Smeared banding pattern”

Under arbeidet med Western blotting opplevde jeg at båndkvaliteten ikke alltid ble som forventet. I flere tilfeller fikk jeg resultater på forsøk hvor filmen viste bånd med haleliknende skygger. Et såkalt ”smeared banding pattern”.

Fig. 5 viser et forsøk av totalErk på hepatocytter med et slik avvikende mønster.

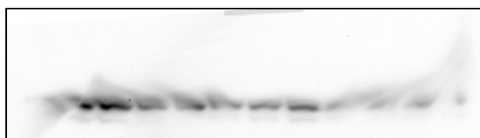


Fig. 5: ”Smeared banding pattern”.  
Filmen viser totalErk på hepatocytter fra celleprøve 11.01.06.

En forklaring på dette er at det enten er proteolytisk nedbrytning som forårsaker tap av høy-molekulære bånd (f.eks. ved preparering av cellelysater til Western blotting), eller at håndteringen av gelen ved overføring til Trans-Blot SD semi-tørr cellemodul for blotting, har forårsaket bånd ”smurt” utover filmen.

Hardhendt håndtering ved overføringen av gelen over til cellemodulen (avsmittning av proteiner fra gelen til membranen?), reproduerte ikke disse ”smeared banding pattern”. Det jeg observerte var at båndkvaliteten ble bedre da jeg presset ”sandwich-en” godt sammen med en spatel, og derved reduserte avstanden mellom de ulike lagene i ”sandwich-en” med å skyve ut luftbobler og overskuddsbuffer (fig. 3 og fig. 4).

Siden jeg hyppig opplevde flere forsøk med ”smeared banding pattern” fra dette cellelysattet, valgte jeg å preparere nye prøver til Western blotting og opplevde ikke dette fenomenet igjen.

#### ”Skewed or distorted protein bands”

Fremkalling av et tilfeldig forsøk som ser på effekten av ulike konsentrasjoner av gefitinib på fosforylert Erk, ga dette resultatet som betegnes på engelsk som ”skewed or distorted protein bands”, dvs. bånd som er ødelagte og avvikende. Båndene representerer fosforylert Erk under suppresjon av gefitinib. Det jeg hadde forventet på forhånd av dette forsøket, var en film som liknet fig. 7 med to rekker av parallelle bånd i stedet for en rekke med ”tannliknende” bånd (fig. 6).

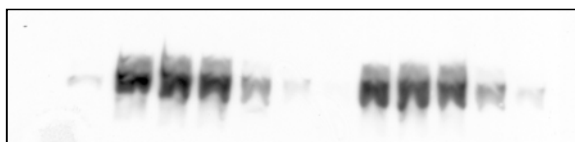


Fig. 6: ”Skewed protein bands”.  
Filmen viser et tilfeldig forsøk med effekt av gefitinib på fosforylert Erk på hepatocytter fra celleprøve 11.01.06.

Støpingen av stacking- og separasjonsgelen skjedde dagen før forsøket ble kjørt. Gelen ble oppbevart kaldt i kjøleskapet med Teflon<sup>®</sup> kammen i, og det hadde dannet seg luftbobler i stacking-gelen under støpebrønnene. Da jeg likevel fortsatte videre med forsøket på denne gelen, oppstod disse ”tannliknende” båndene.

Luftboblene i gelen under støpebrønnen hadde presset proteinene ut av posisjon under konsentreringen av proteinene til volumpakker. Volumpakkene skulle danne den migrerende enhet gjennom gelvandringen mot katoden.

Proteiner i den migrerende enheten er systematisk organisert, men pga av forstyrrelsen kommer organiseringen feil ut for proteinene. ”Skewed protein bands” oppstår og resultatet blir ubrukelig blott.

### 3.2 EFFEKT AV GEFITINIB PÅ EGF-INDUSERT ERK-AKTIVITET

Vekstbetingelsene for cellelinjene MH1C1-celler og hepatocytter er underlagt standardiserte forhold. Metodeutførselen er nøye beskrevet under kapittel 2. Forsøksresultatene, som presenteres her av hepatocytter og MH1C1-celler, er også blitt bekreftet og undersøkt av andre i forskningsgruppe f.eks. Lilleby, 2006.

#### 3.2.1 Dose-virkningskurve av gefitinib på hepatocytter

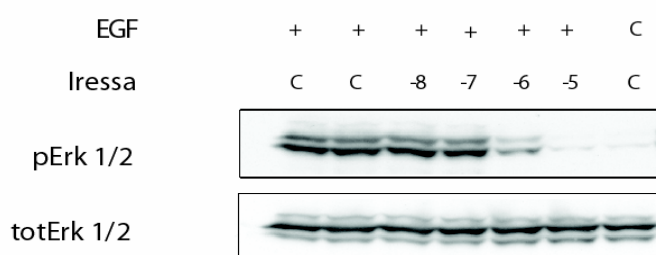


Fig. 7: Effekt av ulike konsentrasjoner av gefitinib på Erk-aktivering. Blottet representerer et typisk forsøk. + = EGF er tilsatt til de respektive brønnene. C = kontroll for både gefitinib og EGF. De negative tallene på figuren er eksponenter, som representerer konsentrasjonen (molar) av gefitinib, f.eks. -8 =  $10^{-8}$  M gefitinib, -7 =  $10^{-7}$  M gefitinib osv.

#### Hepatocytter

**Analyse:** Forsøket bekrefter at EGF-reseptor-mediert aktivering av Erk på hepatocytterne, blir moderat hemmet av gefitinib ved en konsentrasjon på  $10^{-6}$  M. Vi ser at det er total hemning når konsentrasjonen av gefitinib økes til  $10^{-5}$  M, og den halv-maksimal effekten av gefitinib er mellom  $10^{-7}$  M og  $10^{-6}$  M.

Et annet aspekt er at Erk-responsen er tilnærmet lik null uten EGF-stimulering, og er i disse forsøkene kontroll (C). Ved tilstedeværelse av EGF ser vi at Erk-responsen er god i hepatocytterne.

TotalErk 1/2 tilsvarer de to øverste båndene i det nederste blott. Det tredje båndet fremkommer av metodologiske variasjoner og er av ingen betydning i denne sammenheng.

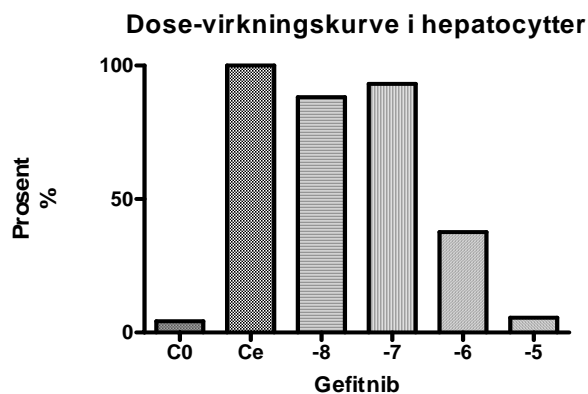


Fig. 8: Kvantitering av foregående blott (fig. 7).

C0 = Kontroll for både EGF og gefitinib. Ce = Tilsatt EGF uten gefitinib. Ce (100 %) er referanse som alle de andre verdiene måles i forhold til.

De negative tallene på figuren er eksponenter, som representerer konsentrasjonen (molar) av gefitinib, f.eks. -8 =  $10^{-8}$  M gefitinib, -7 =  $10^{-7}$  M gefitinib osv.

Diagrammet er en kvantitering av det foregående blot. Y-aksen representerer fosforylert Erk (% av Ce = EGF uten gefitinib). Grafen viser en gradvis reduksjon av Erk-aktivering ved økende konsentrasjoner av gefitinib.

### 3.2.2 Dose-virkning for gefitinib på MH1C1

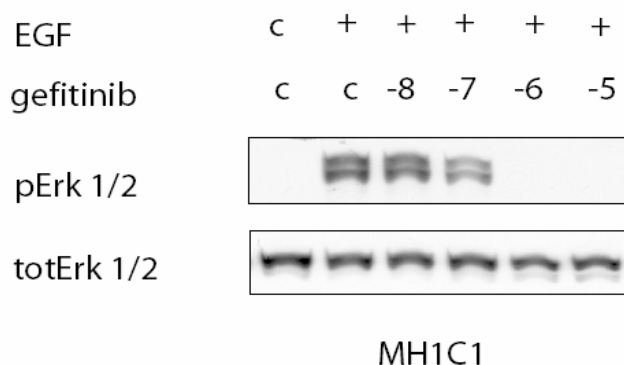


Fig. 9: Effekt av ulike konsentrasjoner av gefitinib på Erk-aktiveringen.

+ = EGF er tilsatt til de respektive brønnene. C = kontroll for både gefitinib og EGF. De negative tallene på figuren er eksponenter, som representerer konsentrasjonen (molar) av gefitinib, f.eks. -8 =  $10^{-8}$  M gefitinib, -7 =  $10^{-7}$  M gefitinib osv.

**Analyse:** Forsøket viser at EGF-reseptor-mediert aktivering av Erk på MH1C1-celler, blir totalhemmet når konsentrasjonen av gefitinib er på  $10^{-6}$  M og moderat hemmet ved en konsentrasjon av gefitinib på  $10^{-7}$  M. Den halvmaksimale effekten av gefitinib er mellom  $10^{-8}$  M og  $10^{-6}$  M.

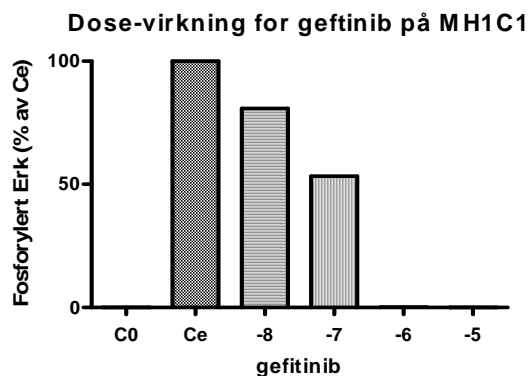


Fig. 10: Kvantitering av foregående blott (fig. 9).

C0 = Kontroll for både EGF og gefitinib. Ce = Tilsatt EGF uten gefitinib. Ce (100 %) er referanse som alle de andre verdiene måles i forhold til. De negative tallene på figuren er eksponenter, som representerer konsentrasjonen (molar) av gefitinib, f.eks. -8 =  $10^{-8}$  M gefitinib, -7 =  $10^{-7}$  M gefitinib osv.

Diagrammet er en kvantitering av det foregående blott. X-aksen representerer konsentrasjonen av gefitinib, og y-aksen representerer fosforylert Erk (% av Ce = EGF uten gefitinib). Grafen viser en gradvis reduksjon av Erk-aktivering ved økende konsentrasjoner av gefitinib.

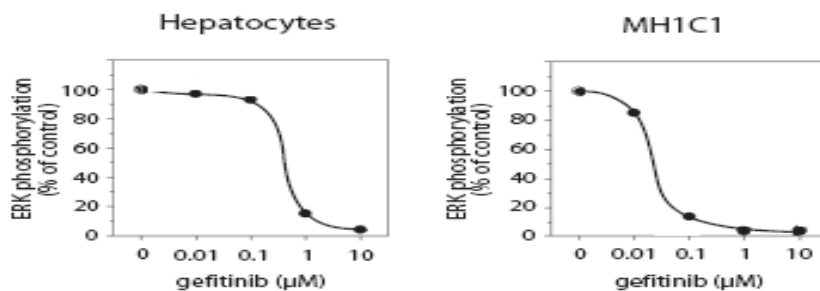


Fig. 11: Effekt av gefitinib med ulike konsentrasjoner på Erk-aktiveringen i hepatocytter og MH1C1-celler.

Effekt av gefitinib med ulike konsentrasjoner på Erk-aktiveringen. Grafene er basert på resultater fra mine forsøk og fra andres i forskningsgruppen. Det er et gjennomsnitt av tre typiske forsøk for hver cellelinje. Y-aksene viser fosforylert Erk og x-aksene  $\mu$ M gefitinib, f.eks. 0,1  $\mu$ M er  $10^{-7}$  M gefitinib, 1  $\mu$ M er  $10^{-6}$  M gefitinib.

Vi kan se en totalhemning av hepatocytter ved en konsentrasjon av gefitinib på  $10^{-6}$  M og en halvmaksimal effekt av gefitinib mellom  $10^{-8}$  M og  $10^{-6}$  M. For hepatocytter derimot ser vi en totalhemning ved en konsentrasjon av gefitinib på  $10^{-5}$  M og en halvmaksimal effekt mellom  $10^{-7}$  M og  $10^{-6}$  M (se underkapitlene 3.2.1 og 3.2.2).

### 3.2.3 DNA-syntese som en funksjon av gefitinib på hepatocytter og hepatomceller

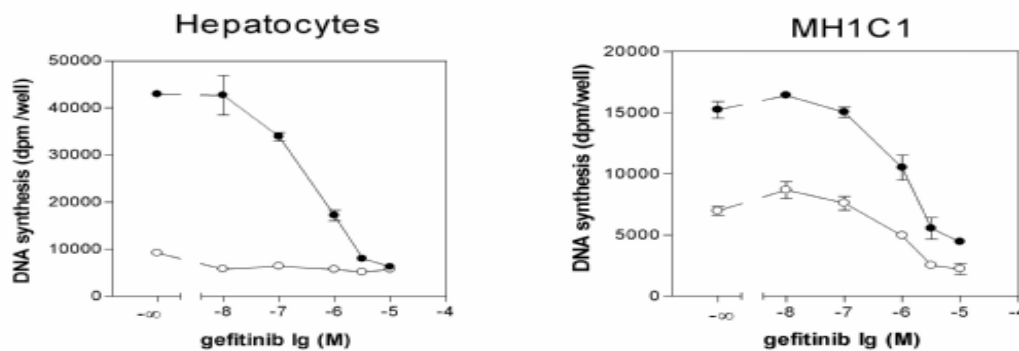


Fig. 12: Effekt av ulike konsentrasjoner av gefitinib på DNA-syntesen.

Y-aksene viser DNA-syntesen i brønnene og er et mål på radioaktiviteten som absorberes i cellekjernene. X-aksen gir et uttrykk for ulike konsentrasjoner (molar) av gefitinib, f.eks. -8 er  $10^{-8}$  M gefitinib. Det første diagrammet viser hepatocytter med EGF tilsatt (øverste graf) og uten EGF (nederste graf). Det andre diagrammet viser MH1C1-celler med serum tilsatt (øverste graf) og uten serum (nederste graf). Diagram av Olav Dajani.

Grafen til hepatocytterne med tilsatt EGF har en begynnende hemning på DNA-syntesen når konsentrasjonen av gefitinib er på  $10^{-8}$  M. Grafen faller, som et tegn på redusert aktivitet ved denne konsentrasjonen av gefitinib. Den halv-maksimale effekten forekommer ved  $10^{-6,5}$  M gefitinib, og vi ser en totalhemning av aktiviteten til DNA-syntesen ved konsentrasjon på  $10^{-5}$  M gefitinib.

Hepatomcellene (MH1C1) med serum viser en omtrentlig utvikling med initieringshemning av gefitinib på  $10^{-8}$  M. Kurven faller gradvis med en halv-maksimal effekt på  $10^{-6}$  M. Totalsupprimering av hepatomcellene (MH1C1) fastslås til å være mellom  $10^{-6}$  og  $10^{-5}$  M.

Disse resultatene er i overensstemmelse med det vi så på i foregående eksempel med Erk-aktivering i hepatocytter og MH1C1-celler under påvirkning av gefitinib. En suppresjon med gefitinib av EGF-reseptor-mediert aktivering av Erk i celler, kan også hemme DNA-syntesen i cellene.

## Kapittel 4: DISKUSJON

### 1.3 METODEUTREDNING

Når proteinene skal analyseres ved bruk av laboratoriemetode som Wb (Western blotting) støter en ofte på metodiske problemer som kan redusere eller ødelegge kvaliteten på blottene. I dette underkapitlet skal jeg gå litt nærmere inn på de problemstillingene som jeg synes er av interesse. Henvisning til andre lærebøker (f.eks. Bio rad: "Protein blotting. A guide to transfer and detection") om avvik av bånd på Western blotting for spesielt interesserte.

#### 1.3.1 Ustabil deteksjon av Erk-bånd på Western blott

Et av problemene som dukket opp under deteksjonen av Erk-bånd på Western blotting, var bånd som forsvant etter en kort tid under deteksjonsprosessen. Dette problemet hadde forekommet tidligere i perioder på avdelingen uten at det fantes en ordentlig forklaring. Under et tilfeldig forsøk fikk jeg dokumentert denne "båndforsvinningen" (fig. 2).

I underkapitlet 3.1 (fig. 2) kan vi se et bilde av tre blott. Disse tre blottene lå i samme filmboks på ulike tidspunkter og for ulike tidsvarigheter. Båndene var utsatt for det samme miljøet og ble stilt under de samme betingelsene.

Den første filmen som lå i filmboksen var eksponert i 30 sek. Med noen minutters mellomrom ble den andre filmen eksponert i et minutt i den samme filmboksen. Et kvarter senere ble den tredje filmen lagt på og eksponert i 2 min. Resultatet er som presentert. Båndsvervingen ble redusert med hensyn til tid, eller sagt på en annen måte så gikk HRP-spaltningen av DAB for fort for deteksjon av Erk-bånd på Western blotting.

Under resultater (kapittel 3) har jeg sett på flere potensielle årsaker og tilnærminger til den ustabile deteksjonen av Erk-bånd på Western blotting. Hypotesene dreide seg rundt forurensning av utstyr på laboratoriet, dårlig kontakt under overføring (transfer) eller blotting, defekte eller gamle ECL-løsninger, forandringer av løsninger eller oppbevaringsfeil.

Hypotesen om forurensning av utstyr satte i gang en rekke beskrevet tiltak. Dette var en viktig hypotese, men det forbedret ikke situasjonen. Det samme resultatet fikk jeg ved de andre foreslåtte tiltakene. Ustabil deteksjon gjorde at filmene ble fortsatt blanke. Kan rutinesvikt være forklaringen? Kritikkverdig oppbevaring av celler, som kunne ha ført til infeksjon eller unødvendig forurensning. Kanskje opphopning av tilfeldige variasjoner er forklaringen på hvorfor det i perioder oppstod slike avvik og at jeg i de samme periodene, opplevde å få gode blott. Muligens så er det ikke en kilde eller en årsak til dette problemet, men en kombinasjon av mange faktorer som gjør det vanskelig å få konkrete svar.

Jeg skal heller ikke se bort i fra at jeg kanskje har oversett flere andre viktige hypoteser som bør undersøkes nærmere, men jeg må stille meg selv spørsmålet om jeg har vært grundig nok til å teste ut hypotesene mine. Har jeg detektert alle viktige forurensningskilder?

På laboratoriet bruker vi mye felles løsningsmidler til å kjøre Western blotting, og det lånes løsninger innbyrdes i forskningsgruppen. Kanskje hadde det vært en ide om å ha egne løsninger og eget utstyr slik at det ble bedre å holde orden og oversikt på laboratoriet? Dette krever ressurser og krav til selvkompetanse, som kan koste laboratoriet mye tid og penger og til og med være vanskelig å gjennomføre praktisk.

#### 1.3.2 Båndavvik

Bånd som avviker fra det vi forventer kan ha ulike form og forskjellige årsaker og løsninger. Det er heller ikke et uvanlig fenomen, for det skal ikke så mye til for å få båndene til å bli meningsløse. Avviket er avhengig av bla. den analytiske variasjonen og feilkilder.

### ***”Smeared banding pattern ”***

Båndene er gnidd utover filmen som i fig. 5. Dette er som sagt enten forårsaket av tap av høy-molekulære bånd (f.eks. ved preparering av cellelysater til Wb), eller at håndteringen av gelen ved overføring til Trans-Blot SD semi-tørr cellemodul for blotting, har forårsaket dette fenomenet.

Jeg testet ut det siste forslaget ved hardhendt håndtering under overføring av gelen til cellemodul og kunne ikke reprodusere dette bånd-mønsteret. Tanken bak forslaget var at kanskje proteinene i gelen avsmittet så mye under overføringen til membranen, slik at du fikk avvikende bånd. Derimot så preparerte jeg nye prøver (cellelysater) til Wb og opplevde ikke dette mønsteret igjen.

Ut fra dette så tror jeg at det er med høy sannsynlighet, enzymatisk nedbrytning i proteinprøvene. Skulle det være tilfelle så er det etter anbefalinger fra lærebøker å preparere nye prøver til WB. Det som taler i mot dette er at jeg hadde da forvente at tilnærmet alle prøver fra dette cellelysate (11.01.06), ville gi meg ”smeared banding pattern”. Ser man bort fra den ujevn gel-overflaten som har forårsaket ”skewed protein bands”, kan vi se at fig. 6 ikke viser bånd som er gnidd utover filmen.

Utbredelsen av den proteolytiske nedbrytningen i celleprøvene har kanskje en betydning for resultatet. Da vil muligens pipetteringen av cellelysate forklare de tilfeldige funnene, om jeg tar av prøver fra bunnen eller toppen av reagensglasset.

Det jeg kan si er at forsøk som ble kjørt på nye cellelysater til Wb, hadde ikke ”smeared banding pattern”. Konklusjonen er at enzymatisk nedbrytning i proteinprøvene forårsaket at båndene ble ”smøret” utover filmen.

### ***”Skewed protein bands”***

Jeg har sett på en av mulige årsaker til ”skewed protein bands” (underkapitlet 3.1.3, fig. 6). Det er mange andre årsaker til hvorfor disse spesielle båndene oppstår. En av årsakene kan være salter i celleprøvene, som reagerer med proteiner i brønnene.

Dårlig polymerisering rundt prøvebrønnene bidrar også med til at konsentreringen av proteiner til volumpakker ikke blir optimalt. Vandringen av volumpakkene mot kationen er usystematisk organisert når konsentreringen i startfasen på vandringen, er i utgangspunktet feil. Dette var tilfelle beskrevet tidligere (fig. 6).

Det samme kan skje ved ujevn geloverflate av både stacking- og separasjonsgel. Problemet rundt dette er at støpeprosessen ikke får nok tid på seg til at gelene blir nok stive, eller at det er bevegelser i væskene under tilstivningen. I lærebøkene står det ulike tiltak som kan være hjelp til, og jeg velger derfor ikke å gå nærmere inn på dette her.

#### **4.1.3 Konklusjon**

Under metodeutredning har jeg først og fremst tatt opp metodiske problemer rundt bånd-fremstillingen. Utredningen har ikke ført frem til noe konkrete svar på ustabil deteksjon av Erk-bånd. Enten foreligger det flere feilkilder og hypoteser som ikke er identifisert, eller så ligger svaret i de utdypete foregående punkter uten at jeg kan helt bekrefte det nå. Siden dette problemet har gjentatte ganger rammet deteksjonen i perioder, kan jeg foreløpig ikke konkludere med noe sikkert enn at det må foretas flere forsøk som kan oppklare saken.

Ulike båndavvik som oppstår under forsøk kan lett korrigeres ved å følge de anbefalte tiltakene som er blitt beskrevet i lærebøkene. I mitt tilfelle fant jeg fort svarene på båndavvikene. ”Smeared banding pattern” var forårsaket av proteolytisk nedbrytning i celleprøvene, og ”skewed protein bands” av ujevne geloverflater.

Min større bevissthet rundt kvaliteten på båndene gjorde det lettere for meg å følge med og forstå det som skjedde på mikronivå under arbeidet med western blotting.

## 4.2 DOSE-VIRKNINGSSAMMENHENG FOR GEFITINIB PÅ ERK-AKTIVITET

Ut fra de forsøkene som presenteres under kapittel 3 av hepatocytter og hepatomceller, kan det se ut til at hepatomcellene (MH1C1) er venstreforskyvet, altså mer sensitiv for eksponering av gefitinib enn hepatocytterne.

Vi kan se en totalhemning av hepatomceller ved en konsentrasjon av gefitinib på  $10^{-6}$  M og en halvmaksimal effekt av gefitinib mellom  $10^{-8}$  M og  $10^{-6}$  M. For hepatocytterne derimot ser vi en totalhemning ved en konsentrasjon av gefitinib på  $10^{-5}$  M, og en halvmaksimal effekt mellom  $10^{-7}$  M og  $10^{-6}$  M (se underkapitlene 3.2.1 og 3.2.2). Denne antydningen har vi sett på tidligere forsøk gjort av andre i forskningsgruppen.

Figur 12 viser to grafer som fremstiller hvordan DNA-syntesen i MH1C1-celler og hepatocytter blir påvirket av gefitinib. Ikke overraskende ser vi en klar tendens med reduksjon i DNA-aktiviteten i de to celletypene når konsentrasjonen av gefitinib øker.

Disse forsøkene er som alle andre påvirket av tilfeldige feil, feilkilder og analytiske variasjoner. Dette er en påvirkning som må tas med i betraktning. På dette stadiet er materialet mitt ikke stort nok til å kunne generalisere, men vi kan se en antydning som kan bekreftes/avkreftes ved flere forsøk. Da er det mulig å samle inn nok materiale til å trekke en slutning om verdiene er representative.

I forhold til tidligere forsøk gjort på instituttet av andre, stemmer dette resultat godt og med god sikkerhet så burde dette følges opp med flere forsøk (fig. 11).

Hvis dette resultatet skulle være representativt, så ville det være klinisk interessant for pasienter med tanke på effekt og bivirkning av farmakologisk kreft-terapi. Pasienter ville da ha større utbytte og glede av gefitinib i antistoffbehandlingen.



## LITTERATURHENVISNING

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P: Part III; 8 Chap: Manipulating proteins, DNA and RNA. In: *Molecular Biology of the cell*. 4<sup>nd</sup> edition, New York: Garland Science, a member of the Taylor & Francis Group, 2002: 485-499.

Beeram M, Patnaik A & Rowinsky EK: Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J clinical oncology*, 2005. 23; 6771-6790.

Berry MN & Friend DS: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structure study. *J Cell Biol*, 1969. 43 (3): 506-520.

Bio Rad: Mini-protean<sup>®</sup> II. Elektroforese Celle. Instruksjonsmanual, USA.

Bio Rad: Protein blotting. A guide to transfer and detection. 2<sup>nd</sup> edition, USA.

Chang L & Karin M: Mammalian map kinase signaling cascades. *Nature*. March 2007; 410: 37-40

Christoffersen T, Thoresen GH, Dajani OF, Melien Ø, Guren T, Refsnes M & Sandnes D: Mechanisms of hepatocytes growth regulations by hormones and growth factors. In: *The Hepatocyte Rev*. Berry MN & Edwards AM, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 2000; 209-246.

Dancey J & Sausville EA: Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nature publishing group*. 2003 april; 2: 296-313.

Dancey JE: Molecular targeting: PI3 kinase pathway. *Ann oncol*, 2004; 15(4): iv233-iv239.

Dawood M: Effekter av EGF og agonister som virker via G-proteinkoblede reseptorer på koloncancercellelinjene HT29 og HCT116. Masteroppgave, våren 2006. Universitet i Oslo. Unipub AS.

Dunbar BS (ed): Protein blotting. A practical approach. USA: *Oxford University Press*, 1994.

Foreman JC & Johansen T (ed): Molecular structure of Tyrosine kinase-linked receptors. In: *Textbook of receptor pharmacology*. CRC Press, Inc. 1996; 101-117.

Foster FM, Traer CJ, Abraham SM & Fry MJ: The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Science*, 2003. 116: 3037-3040.

Giehl K: Oncogenic ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem*, mars 2005. 386; 193-205.

Guren TK, Ødegård J, Abrahamsen H, Thoresen GH, Susa M, Andersson Y & Christoffersen T: EGF receptor-mediated, c-Src-dependent, Activation of Stat5b is downregulated in mitogenically responsive hepatocytes. *J Cell Physiol*. 2003; 196: 113-123.

Hilger RA, Scheulen ME & Strumberg D: The Ras-Raf-MEK-Erk pathway in the treatment of cancer. *Oncologie*, 2002. 25; 511-518.

Holbro T, Civenni G & Hynes NE: The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research* 284, 2003; 99-100.

Holbro T & Hynes NE: ErbB receptors: Directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 195-217.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW & Burgess AW: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Experimental Cell Research* 284, 2003; 31-53.

Lilleby P: Prostaglandin E<sub>2</sub> amplifies epidermal growth factor-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) in hepatocytes. Prosjektoppgave i medisin, vår 2006. Universitetet i Oslo.

Luo JI, Manning BD & Cantley LC: Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and Promise. *Cancer Cell*. 2003 oct; 4:257-262.

Meisdalen K: G-proteinkoblede reseptorer, cyklooksygenaser og kreftfarmakologi. Masteroppgave, høst 2003. Universitet i Oslo. Unipub AS.

Mendelsohn J & Baselga J: Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clinical Oncology*. July 2003; 21: 2787-2799.

Mendelsohn J & Baselga J: The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6550-6565.

Nilssen LS, Ødegård J, Thoresen GH, Molven A, Sandnes D & Christoffersen T: G protein-coupled receptor agonist-stimulated expression of ATF3/LRF-1 and comitogenic effects in hepatocytes do not require EGF receptor transactivation. *J Cell Physiol*, 2004; 201: 349-358.

Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225.

Seglen PO: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976. 13: 29-83.

Sordella R, Bell DW, Haber DA & Settleman J: Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*, 2004 aug; 305: 1163-1167.

Thompson JE & Thompson CB: Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol*, 2004. 22 (20): 4217-4226.

Thoresen GH, Guren TK & Christoffersen C: Role of Erk, p38 and PI3-kinase in EGF receptor-mediated mitogenic signaling in cultured rat hepatocytes: Requirement for sustained Erk activation. *Cell Physiol Biochem*, 2003; 13: 229-238.

Thoresen GH, Guren TK, Sandnes D, Peak M, Agius L & Christoffersen T: Respons to transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) and epidermal growth factor (EGF) in hepatocytes: Lower EGF receptor affinity of TGF- $\alpha$  is associated with a more sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase and a greater efficacy in stimulation of DNA synthesis. *J Cell Physiol*, 1998. 175(1): 10-18

Vara JAF, Casado E, Castro DJ, Cejas P, Belda-Iniesta C & Gonzalez-Baron M: PI3K/Akt signaling pathway and cancer. *Cancer Treatment rev*, 2004; 30: 193-204.

Vivanco I & Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature rev cancer*, July 2002; 2: 489-501.

Vogelstein B & Kinzler KW: Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, Aug 2004; 10: 789-799.

Weinstein-Oppenheimer CR, Blalock WL, Steelman LS, Chang F & Mccubery JA: The raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000. 88; 229-279.

Wujcik D: EGFR as a target: Rational for therapy. *Oncology Nursing*, Feb 2006; 22: 5-9.

Yoeli-Lerner M & Toker A: Akt/PKB signaling in cancer. A function in cell motility and invasion. *Cell Cycle*, 2006. 5; 603-605.

Yoshinaga M, Buchanan GF & Dubois RN: 15-LOX-1 inhibits p21 (Cip/WAF 1) expression by enhancing MEK-Erk 1/2 signaling in colon carcinoma cells. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 2004; 73: 111-122.

Ødegaard J: The role of epidermal growth factor mediated signaling in mitogenic activation of hepatocytes. *Vår* 2005.

<http://www.duo.uio.no/publ/medisin/2005/24562/rettetforslinjoppgepubJohnOdegard2.pdf>